

学 位 論 文 要 旨

学位論文題名

(和文題名)

骨格筋ミトコンドリア呼吸におけるミオグロビンの役割

(英文題名)

The role of myoglobin for the mitochondrial respiration in skeletal muscle

金沢大学大学院自然科学研究科
生命科学専攻 動態生理学講座

学籍番号 1223032007

氏 名 山田 達也

Abstract

Mitochondrial respiration is dynamically regulated especially in skeletal muscle because of the highly fluctuating energy demand between the active and inactive state. Myoglobin (Mb) is a conserved cytosolic protein, which have prosthetic heme and can bind O₂. Previous study revealed that Mb was deoxygenated immediately accompanying the increase of O₂ demand in the contracting skeletal muscle. However, it was totally unknown how cytosolic Mb could recognize the increase of mitochondrial O₂ demand instantly. Therefore, we hypothesized that Mb localized in mitochondria and work for its respiration. Here, we demonstrated that Mb localized in mitochondria and interact with complex IV. Although citrate synthase activity was suppressed in stably Mb overexpressing myotubes, those myotubes consume O₂ faster than Mock cells. This encouragement of respiratory capacity would be due to the activation of enzymatic function of respiratory complexes. 4 respiratory complexes (complex I-IV) activities were increased in stably Mb overexpressing myotubes. Thus, Mb overexpressing myotubes can spare energy substrates and respire effectively. Moreover, mitochondrial respiration was upregulated also in transiently Mb overexpressing myoblasts. In this model, complex IV activity was solely activated and this augmentative effect was canceled by interferences of Mb expression. Therefore, Mb is the factor that enhances enzymatic activity of complex IV to ameliorate mitochondrial respiratory capacity and also it would contribute to the acquisition of efficient respiratory capacity of mitochondria at differentiation state of myocytes.

I. 緒言

骨格筋ミトコンドリアの呼吸は他の組織のミトコンドリアに比較して極めて動的に変動する。なぜなら、骨格筋組織の安静時と収縮時における酸素需要は劇的に異なるためである。このように特徴的な酸素代謝を行う骨格筋組織には酸素結合タンパク質のミオグロビン (Myoglobin; Mb) が存在している。この Mb は筋細胞内において酸素の貯蔵と促進拡散機能を主に担っていると考えられてきた。そのため、ミトコンドリアへの酸素運搬に Mb は直接的に関与していないと考えられてきた。

Garry et al. (1998) は Mb を生体内からノックアウトしても寿命や繁殖能力、運動能力に影響が表れないと報告した。その後続く研究によって Mb ノックアウト (Mb^{-/-}) マウスには、毛細血管の増加、抗酸化タンパク質の増加、ミトコンドリアに関連する遺伝子発現が増加するなどの代償作用が生じることが明らかにされた。つまり、生体内の Mb が何らかの役割を果たすことが示唆された一方で、酸素代謝機構における Mb の具体的な役割が不明であったことから、Mb の重要性は低く見積もられたままであった。そして Mb^{-/-}マウスの生理学的な表現系に大きな欠損が見られなかった事実は、具体的な Mb 機能を解明していく速度を鈍化させた。

それに対して、新たな測定技術を用いた近年の報告では、酸素代謝に関わる Mb の役割に新たな視点が提供されている。まず、筋収縮の開始と同時に亢進するミトコンドリアの酸素需要に応じて Mb は即時的に酸素を解離することが明らかとなり、ミトコンドリアの酸素需要の亢進に応じて Mb からの酸素供給が増加することが報告された。また、*in vivo* における Mb の拡散速度は遅く、Mb による酸素の促進拡散機能は細胞内の酸素分圧が極端に低下した状態でないと細胞外からの酸素流入にほとんど貢献しないことが示された。これらの知見は Mb が細胞外から細胞内への酸素の流入を促進する役目よりも、ミトコンドリアへ酸素を供給する役割に重きがあることを示唆している。実際に Mb の酸素結合機能を阻害するとミトコンドリア呼吸活性が低下するという古くからの報告もある。したがって、これらの先行研究を考慮すると Mb がミトコンドリア呼吸に直接的に関与しているのではないかと推察される。しかしながら、細胞質の浮遊タンパク質である Mb はどのようなメカニズムを介してミトコンドリアの酸素需要の亢進に応じた即時的な脱酸素化を可能にしているのかは不明であった。細胞質のみに局在する Mb が、拡散速度が低いにも関わらずミトコンドリアの酸素需要に応じた即時的な脱酸素化を可能にする仕組みの 1 つとして、Mb がミトコンドリアに近接もしくは接着するという仮説を立てた。さらに、本研究ではミトコンドリアに局在する Mb が担う機能を検証した。ミトコンドリアに局在する Mb は呼吸鎖複合体 IV (complex IV) と相互作用する可能性が示唆されたため、Mb は呼吸調節機構を修飾する因子の 1 つであるという仮説を基に分析を実施した。

II. 研究課題

本研究では上述の目的を達成するために、以下の研究課題を設定した。

【研究課題 1】ミトコンドリアに局在する Mb の特徴（実験 I）

従来の概念では、Mb は細胞質のみに局在する浮游タンパク質であると見なされてきた。実験 I ではラット骨格筋細胞内における Mb の局在性を組織学と生化学の手法を用いて分析し、Mb がミトコンドリアに近接もしくは接着しているか否かを検証した。加えて、ミトコンドリアに局在する Mb の特徴を異なる代謝特性を有する筋組織の比較を通じて分析した。

【研究課題 2】Mb を過剰発現させた筋管細胞においてミトコンドリアが示す表現系（実験 II）

実験 I の結果から Mb はミトコンドリア内にも局在し complex IV と相互作用することが示された。そこで、実験 II ではミトコンドリアに局在する Mb が果たす役割を検証した。Mb 過剰発現筋管細胞モデルを構築し、Mb 発現が増加した筋管細胞においてミトコンドリアの酸素消費が亢進するか否かを検証した。また、呼吸鎖複合体を構成する複合体の酵素活性も測定した。

【研究課題 3】一過性に Mb 遺伝子を改変した筋芽細胞のミトコンドリアが示す表現系（実験 III）

実験 II の結果から Mb の発現が増加することによって、ミトコンドリア呼吸が効率化する可能性が示唆された。実験 III では、実験 II に用いたモデルに生じたと考えられる適応の影響を排除し、ミトコンドリアにおける Mb の機能を分子レベルで明らかにすることを目的とした。本実験では一過性 Mb 遺伝子改変モデルを用い、Mb の過剰発現と発現抑制細胞におけるミトコンドリアの呼吸機能（酸素消費、酵素活性）を分析した。

III. 方法および結果

【実験 I】ミトコンドリアに局在する Mb の特徴

実験 I では免疫蛍光抗体法と電子顕微鏡観察によって、組織学的に Mb の局在性を分析した。免疫蛍光抗体法ではミトコンドリアマーカータンパク質の蛍光と Mb の蛍光が重なることが確認された。また、電子顕微鏡を用いた筋組織の観察によってミトコンドリアの内側においても Mb の局在が確認された。

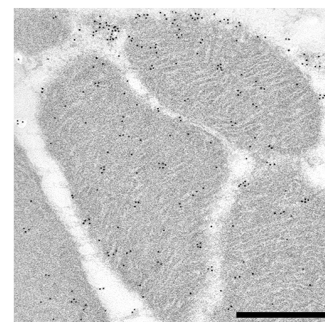


Figure 1. Electron microscopic imaging of Mb in mitochondria.
Mb immunogold labeling in GasD tissue shows mitochondrial localization of Mb. bar = 500 nm. Sections are 80 nm-thin.

加えて、遠心分離法を用いて骨格筋から抽出したミトコンドリアから Mb が検出された。さらにその Mb はミトコンドリアにおいて酸素の還元を担う complex IV と相互作用していることが明らかになった。ミトコンドリアから検出される Mb の量は有酸素代謝能に優れた骨格筋ほど多かった。これらの結果から、筋細胞内において Mb はミトコンドリア内にも局在し、ミトコンドリアに局在する Mb はミトコンドリアの呼吸調節や筋組織の有酸素代謝能力に影響を及ぼすことが推察される。

【実験 II】 Mb を過剰発現させた筋管細胞においてミトコンドリアが示す表現系

実験 I において Mb がミトコンドリアに局在し、ミトコンドリア呼吸や有酸素代謝の調節に関連する可能性が示唆されたため、実験 II においてはミトコンドリアに局在する Mb がミトコンドリアの呼吸調節に関与するかを直接的に検証した。マウス骨格筋培養細胞 C2C12 を基にして Mb の安定発現株を構築した。この細胞を分化誘導することによって Mb 過剰発現筋管モデルを作出して分析に用いた。Mb 過剰発現筋管は対照細胞に比べて酸素消費速度が早く、complex I から IV の呼吸鎖複合体の酵素活性も上昇した。その一方で呼吸基質を合成する TCA 回路の律速酵素であるクエン酸合成酵素（CS）活性は減少した。したがって、Mb の発現が安定的に増加すると呼吸基質の産生は抑制されるものの呼吸鎖複合体の酵素活性がそれぞれ増加するために、ミトコンドリアの酸素消費が亢進する。つまり、Mb の過剰発現によって細胞内のミトコンドリアが効率的な呼吸調節機構を獲得したと推察される。

【実験 III】 一過性に Mb 遺伝子を改変した筋芽細胞のミトコンドリアが示す表現系

実験 II では安定発現株に分化誘導を施したため、培養期間中に適応が生じた可能性がある。したがって、Mb が担う役割を分子レベルで理解するためには異なるモデルを用いる必要があった。したがって、実験 III では一過性に Mb 遺伝子を改変した C2C12 を用いて分析を行った。実験 III では Mb 発現ベクターと Mb-siRNA を C2C12 の筋芽細胞に導入することによって Mb 過剰発現モデルと Mb 発現抑制モデルを構築した。各遺伝子改変モデルのミトコンドリア呼吸を測定したところ、Mb 過剰発現細胞は対照細胞に比べて有意に酸素消費速度が上昇した。その一方で Mb 発現抑制細胞は対照細胞との間に有意な差は認められなかった。つまり、Mb の発現が増加することによって呼吸が亢進し、発現を抑制すると呼吸の亢進が相殺されたということになる。また、呼吸鎖複合体の酵素活性を比較したところ、complex IV の酵素活性のみが Mb の発現量に依存して調節された。この結果は Mb が complex IV の酵素活性の調節に特異的に関与していることを示唆している。

実験 III をまとめると Mb は complex IV の酵素活性を亢進させる役割を担っており、Mb 量が増加すると complex IV の酵素活性も亢進するため、その結果ミトコンドリアによる酸

素消費も上昇したと考えられる。したがって、Mb は呼吸調節機構の重要な因子の 1 つであることが示された。

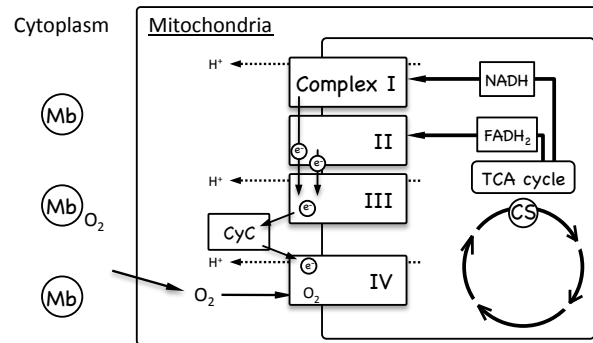
V. 結論

本研究では筋細胞内における Mb の局在性を検証し直すことによって、ミトコンドリアの内部に Mb が局在することを始めて明らかにした。ミトコンドリアに局在する Mb は呼吸鎖複合体の complex IV と相互作用しており、ミトコンドリア呼吸の調節に Mb が直接的に関わることが示唆された。また、有酸素代謝能力に優れた筋組織のミトコンドリアにおける Mb 量が豊富であることから、ミトコンドリアの Mb は酸素代謝に関連する機能を担うと推察された。本研究では、分子生物学的手法を用いて筋細胞内において Mb の発現量を調節し、Mb 量の多寡がミトコン

ドリアの呼吸調節機能に及ぼす影響を検証した。その結果、Mb は complex IV の酵素活性を特異的に修飾する機能を担うことが明らかとなり、ミトコンドリアによる酸素消費を亢進させる重要な因子であることが示唆された。通常の筋細胞において Mb の発現は分化開始と同時に誘導される。したがって骨格筋の分化期間に Mb の発現が増加すると効率的な呼吸調節機構を備えたミトコンドリアが増加すると推察される。つまり、骨格筋細胞が分化する過程において、ミトコンドリアが呼吸機能を獲得するのに Mb が貢献していると考えられる。

Mb が complex IV の酵素活性を上昇させるメカニズムや、分化過程においてミトコンドリアの呼吸機能の獲得に貢献する詳細な仕組みは不明であるもののミトコンドリアと Mb が直接的な関連性を持ち、細胞の呼吸調節やエネルギー代謝の調節に影響を与える可能性を示した点が本研究によって得られた最も重要な成果である。

A: Existing concept



B: Novel concept

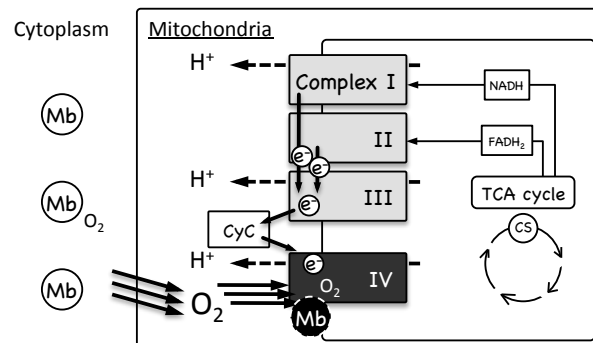


Figure 2. Schematic diagram of mitochondrial respiration in myocyte.

学位論文審査報告書（甲）

1. 学位論文題目（外国語の場合は和訳を付けること。）

骨格筋ミトコンドリア呼吸におけるミオグロビンの役割

2. 論文提出者 (1) 所 属 生命科学 専攻

(2) 氏 名 ^{ふり} ^{がな} ^{やまだ} ^{たつや}
山田 達也

3. 審査結果の要旨（600～650 字）

本論文では、骨格筋に豊富に存在するものの生理学的な存在意義が不明瞭であったタンパク質：ミオグロビン（Mb）に関して、Mb が骨格筋のミトコンドリア呼吸機能を亢進させる役割を持つことを新たに示した。まず始めにラットの骨格筋細胞内における Mb の局在性を再検証した。従来の知見と異なり、Mb は細胞質のみならずミトコンドリアにも局在し、酸素の還元を担う複合体 4 と相互作用することが示された。この知見に基づいて Mb がミトコンドリアの呼吸機能を調節するかが検証された。この検証には 2 種類の遺伝子改変モデルが用いられた。1 つは Mb の安定過剰発現株を分化誘導した筋管細胞モデル、もう 1 つは分化前の筋芽細胞を用いて一過性に Mb 遺伝子を過剰発現もしくは抑制したモデルである。この 2 種類の細胞モデルを用いた主な実験結果は次の通りである。Mb は相互作用する複合体 4 の酵素活性を特異的に亢進させ、ミトコンドリアによる酸素消費速度の亢進を引き起こす。また、Mb を過剰発現させた細胞を分化誘導すると、分化の過程においてミトコンドリアの呼吸調節機構が効率化する。具体的には呼吸基質の供給を担う CS 活性は減少する一方、4 つの呼吸鎖複合体の酵素活性が亢進し、ミトコンドリアの酸素消費速度が亢進する。以上のように本論文では、Mb がミトコンドリア呼吸を調節する因子の一つであることを多角的なデータに基づいて示し、筋細胞内における Mb の存在意義を再定義した。したがって、審査委員会は本論文が博士（学術）に値すると判断した。

(641 文字)

4. 審査結果 (1) 判定（いずれかに○印） ☒ 合格 ・ 不合格

(2) 授与学位 博士（学術）